**Journal of Iranian Plant Protection Research**
https://jpp.um.ac.ir

**Research Article**
**Vol. 38, No. 3, 2024, p. 227-240**

# Application of the Toxin Produced by Esca-Associated Fungi as a Bioassay Method for Screening Grapevine Cultivars

**Mahmoud Reza Karimi Shahri**[1*]
1- Department of Plant Protection, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.
(*- Corresponding Author Email: karimi_in@yahoo.com)

Received: 12-11-2023
Revised: 19-06-2024
Accepted: 24-06-2024
Available Online:28-12-2024

**How to cite this article:**
Karimi Shahri, M.R. (2024). Application of toxin produced by Esca-associated fungi as a bioassay method for screening grapevine cultivars. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *38*(3), 227-240. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2024.85310.1165

## Introduction

Esca of grapevine (*Vitis vinifera*) is an important complex disease in almost all areas, where grapevines are grown. The symptoms of this disease may affect the trunk, branches, shoots (brown wood-streaking and white rot of trunk), leaves (light green or chlorotic, irregular areas between the veins or along the leaf margin, which gradually spread from the basal to the distal parts of the shoot) and fruit (tiny brown spots and sometimes wilt of berries). Toxins are secondary metabolites, which are important virulence factors of phytopathogenic fungi. *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), and *Fomitiporia mediterranea* (Fme) produced two pentaketides (scytalone and isosclerone), and the α-glucan named pullulan. Several evidences indicated that at least some of these metabolites may induce the characteristic symptoms of diseases. The main objective of this research was to establish a clear efficient and cheap method using callus and extracted toxic metabolites in order to select susceptible, tolerant, or resistant commercial grapevine cultivars to the esca disease.

## Materials and Methods

Esca-associated fungi were obtained from the Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Khorasan Razavi province, Iran. Five mL of a suspension of three mentioned fungi (10-day-old) in 50 ml sterile water were added to 1 L flask containing 150 mL Czapek Dox medium amended with 0.1% yeast and 0.1% malt extract. They were incubated at 25˚C for 28 days in the dark. The mycelia were removed by filtration using Filter membranes, nitrocellulose 0.22 µm. The toxic secondary metabolites were extracted from this suspension. Briefly, the culture filtrates from each fungus (2 L per strain) were treated with equal volumes of cold ethanol-acetone and incubated in an ice batch for 4 to 6 hours. The resulting precipitates were extracted by centrifugation at 3000 rpm for 10 seconds. Recrystallization was done by dissolving the polymer in hot water and adding the same volume of ethanol to it, and the formed precipitate was filtered through a Whatman filter, dried at 40°C and weighed. The toxic metabolite obtained from liquid cultures of each fungal species was assayed on detached leaves of 5 grapevine commercial cultivars of Khorasan Razavi province, including Torkaman8(TU8), Kolahdari(KOL), Torkaman6(TU6), Fakhri Shahrood(FSH), and Keshmeshi-Quchan(KQU). The leaves with their petioles were immersed in a 3 mL solution until complete absorption, which usually took a few hours, and then were transferred to


https://doi.org/10.22067/jpp.2024.85310.1165

distilled water. Callus of the five grapevine cultivars, micro propagated shoot cultures were cultivated on modified MS media containing 15, 30, and 45% toxic metabolites. The grown callus was inoculated with different concentrations of toxic metabolites, then dry weight of callus and vital cells were measured visually, as well as spectrophotometrically, by using Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC).

**Results and Discussion**

The Pal, Pch, and Fme fungi were all able to produce toxic secondary metabolites, but an isolate of the Pal fungus obtained from Memlejeh (a village in the Central District of Bojnord County, North Khorasan Province, Iran.) produced a large amount of pullulan. The symptoms produced on the detached leaves that absorbed a toxic solution were quite similar to those observed on the leaves of the same cultivars naturally infected by the same fungal species. Differences between cultivars in symptom severity were also observed under experimental conditions. The results showed that reduction of the callus dry weight in TU8 grapevine cultivar was the lowest (26%) compared to the other cultivars tested, followed by KOL (31%) and TU6 (40%) cultivars. The KQU and FSH cultivars showed the highest reduction in callus dry weight (48% and 44%, respectively). The effect of pullulan produced by three important esca-associated fungi indicated that the toxin produced by the Fme fungus had the least effect and the Pal fungus showed the greatest effect in reducing dry weight of the callus. Dry weight of the callus in 15% concentration of the toxic metabolite showed the least decrease and maximum decrease of the callus weight was obtained in 45% concentration. Among the cultivars tested, the callus cells of Torkaman 8 had the highest optical density, which means the number of living cells was more than other cultivars. The KQU cultivar with minimal live callus cells showed more sensitivity to the metabolite. Toxin of the Fme fungus had the least and that of the Pal fungus had the most effect on the callus cells. The percentage of survival rate in the inoculated callus cells of Torkaman 8 compared to the KQU cultivar at 45% concentration of the extract was about 50.36% and the survival rate in the KQU cultivar was about 15.51%. Also, the obtained results showed that the grapevine cultivar TU8 was comparatively more tolerant than other cultivars tested. On the other hand, the FSH and KQU cultivars were susceptible to secondary metabolite of the mentioned fungi.

**Conclusions**

Occurrence of the esca diseases is increasing in grapevine all over the world, whereas efficient therapeutic strategies are lacking. The use of toxic metabolites of esca-associated fungi and tissue culture of the host plants under *in vitro* conditions could be cheap,easy, and helpful assays for controlling the disease via selection, improvement, and reproduction of the tolerant genotypes. According to the reaction of grapevine cultivars to the secondary metaboilte of esca-associated fungi, it can be concluded that the TU8 grapevine cultivar is less sensitive than the KQU grapevine cultivar against the esca disease.

**Keywords:** Callus, Grapevine decline, Secondary metabolite

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۲۴۰-۲۲۷

# استفاده از توکسین تولیدی قارچ‌های مولد اسکای مو به‌عنوان روش زیست‌سنجی برای غربالگری ارقام انگور

محمود رضا کریمی شهری[1*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

## چکیده

بیماری اسکای مو یک بیماری کمپلکس و پیچیده است که علایم ایجاد شده تحت تأثیر فاکتورهای محیطی و عوامل پاتوژنیکی متفاوتی می‌باشد. اغلب عوامل پاتوژنیک تولید متابولیت‌های سمی داخل گیاه مـی‌کننـد کـه ممکـن اسـت محـرک علایـم بیمـاری باشـند. عوامـل قـارچی مهـم اسـکا شـامل *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal)، *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch) و *Fomitiporia mediterranea* (Fme) بوده که تولید متابولیت‌های ثانویه می‌کنند و احتمالاً در ایجاد علایم بیماری اسکای مو نقش مهمی دارند. پولولان یـک پلی‌سـاکارید خطـی و متابولیت ثانویه مهم بوده که توسط قارچ‌های Pa1، Pch و Fme تولید می‌شود. در این آزمایش اثر پولولان برکاهش وزن‌کالوس پنج رقم انگور تجاری استان خراسان رضوی شامل‌کلاهداری، ترکمن ۸، ترکمن ۶، فخـری شـاهرود و کشمشـی‌قوچان و همچنـین تـأثیر آن بـر فعالیـت‌هـای فیزیولـوژیکی (زنده‌مانی کالوس) با استفاده از اسپکترفتومتر ارزیابی شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. هدف اصلی این تحقیق ارزیابی روشی ساده و سریع جهت غربالگری ارقـام مختلـف انگـور بـه بیمـاری اسـکا بـود. بـرای ایـن منظـور اسـتخراج متابولیـت ثانویـه اگزوپلی‌ساکارید (پولولان) از قارچ‌ها انجام و تولید کالوس پنج رقم انگور تجاری نیز با استفاده از محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) صورت گرفت. سپس کالوس‌ها با غلظت‌های مختلفی (۱۵٪، ۳۰٪ و ۴۵٪) از پولولان مایه‌زنی شدند. همچنین تأثیر متابولیت استخراجی روی برگ‌هـای جداشـده نیـز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دادند که قارچ Pal میزان پولولان بیشتری تولید کرد. تمامی برگ‌های انگور جداشده علایمی به‌صـورت آب سوختگی پهنک برگ (بین‌رگبرگ‌ها) را نشان داد و قسمت‌های آب‌سوخته نکروزه و قهوه‌ای شدند. همچنین نتایج نشان داد کـه توکسـین پولـولان اثـر قابل توجهی بر کاهش وزن خشک کالوس ارقام مختلف انگور مورد آزمایش دارد. رقم انگور ترکمن ۸ نسبت به سایر ارقام مورد آزمـایش دارای درصـد کاهش وزن کالوس کمتری بود (۲۶٪) و پس از آن ارقام کلاهداری (۳۱٪) و ترکمن ۶ (۴۰٪) در گروه‌های بعدی قرار گرفته‌اند. ارقام کشمشی قوچـان (۴۸٪) و فخری شاهرود (۴۴٪) بیشترین کاهش وزن خشک کالوس را در پی داشته است. مجموع اثرات متقابل رقم، توکسین و قارچ‌های عامـل مولـد اسکا نشان داد که رقم ترکمن ۸ در مقابل غلظت ۴۵٪ توکسین تولید شده توسط قارچ Pal کمترین‌کاهش وزن کالوس به میزان ۶۵٪ را نسبت به شاهد داشته است و بیشترین کاهش وزن کالوس به میزان ۹۰٪ مربوط به رقم کشمشی قوچان بود. با توجه واکنش ارقام انگور نسبت به توکسین قـارچ‌هـای مولد اسکا می‌توان نتیجه گرفت‌که رقم انگورترکمن ۸ حساسیت کمتری نسبت به رقم انگور کشمشی قوچان در مقابل بیمـاری اسـکای انگـور از خـود نشان خواهد داد. سلول‌های کالوس رقم ترکمن ۸ بیشترین شدت جذب نوری را داشت یعنی تعداد سلول‌های زنده آنها نسبت به سایر ارقام بیشـتر بـود. رقم کشمشی قوچان با حداقل سلول‌های زنده کالوس حساسیت بیشتری به توکسین نشان داد و دارای شدت جذب نوری کمتری بود.

**واژه‌های کلیدی:** زوال تدریجی انگور، کالوس، متابولیت ثانویه

۱- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: karimi_in@yahoo.com)

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.85310.1165

## مقدمه

بیماری اسکا به‌عنوان یک عارضه پیچیده است که دو نوع پوسیدگی چوب و پوسیدگی آوندی تنه انگور ایجاد میکند (Surico *et al.*, 2008; Surico, 2009; Gramaje *et al.*, 2011). پوسیدگی آوندی که اغلب توسط قارچ‌های *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch) و *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal) بوجود می‌آید که بیشترین فراوانی را نیزدارند. قارچ *Phaeoacremonium* دارای ۲۴ گونه است که از تنه و شاخه‌های انگور با علایم و بدون علایم از مناطق مختلف دنیا جداسازی شده‌است (Mugnai *et al.*, 1999 ; Mostert *et al.*, 2006;). سندرم آوندی به سه صورت مشاهده می‌شود که عبارتند ازخطوط قهوه‌ای در چوب، بیماری پتری و علایم نواری برگ که قبلاًتحت عنوان اسکای جوان نامیده می‌شد (Mugnai *et al.*, 1999; Surico, 2009;). خطوط منقوط چوب درواقع یک آلودگی اولیه هستند که از طریق قلمه‌های آلوده بوجود آمده، باعث تغییر رنگ چوب و نکروز آوندی می‌شوند و غالباً زمانی که هنوز انگور تولید برگ نکرده اتفاق می‌افتند. علایم هوایی شامل نکروز حاشیه برگ‌ها، نکروز پهنک برگ‌ها، سوختگی، قرمز و زرد شدن برگ‌ها و همچنین سبز باقی ماندن اطراف رگبرگ‌ها هستند که حالت پوست ببری به برگ می‌دهد. تمامی این علایم با علایم داخلی تنه به غیرازپوسیدگی سفید (*Fomitiporia mediterranea*) در ارتباط هستند و اما تاکنون ارتباطی بین علایم هوایی و پوسیدگی سفید داخل تنه دیده نشده‌است ( Fisher& Payghami Ashnaei, 2019; Beris *et al.*, 2022;Fox,2022). کشت بافت و ریزازیادی جوانه انتهایی روش‌های ساده و راحتی هستند که برای ارزیابی زیستی و همچنین تعیین حساسیت و مقاومت گیاهان، ارتباطات بین گیاهان متحمل و حساس نسبت به بیمارگر و یا واکنش بین توکسین‌ها و گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرند ( Sparapano *et al.*, 2001). بیمارگرهای گیاهی ترکیبات مختلفی برروی میزبانشان در داخل خاک و یا در محیط‌های کشت مصنوعی تولید می‌کنند و برخی از این ترکیبات در بخش‌های شیمی، بیولوژی، واکنش بین گیاه و بیمارگر و ارتباطات بیولوژیکی تقسیم‌بندی می‌شوند. در بین این متابولیت‌ها، ترکیبات سمی بیشتر برای بیماری‌شناس‌ها جذاب بوده و به‌عنوان محرک‌های بیماری و یا فاکتورهای بیماری‌زا و مهاجم بیماری محسوب می‌شوند. گیاهان حساس به بیمارگر به توکسین‌ها نیز حساس هستند (Sparapano & Evidente, 1995).

توکسین‌های غیر اختصاصی نقش مهمی در بیماری‌زایی داشته که اگر در ساختمان مولکولی توکسین‌ها خللی ایجاد گردد و یا به نحوی تجزیه شوند، از آلوده شدن گیاه نیز جلوگیری خواهد شد ( Graniti *et al.*, 2013). توکسین‌های قارچ‌های مولد اسکا شامل دو نوع پلی‌کتید به نام‌های سیتالون[1] و ایزواسکلرون[2] و یک نوع آلفاگلوکان به نام پولولان[3]می‌باشد. پولولان، پلی‌ساکارید خارج سلولی[4] است که توسط برخی قارچ‌ها ازجمله قارچ‌های مولد اسکا تولید می‌شود و نقش مهمی در بیماری‌زایی این عوامل بر روی انگور دارد. این ماده در صنعت غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد و تاکنون گزارشی در خصوص سمیت آن بر روی انسان و حیوانات وجود ندارد. خاصیت سمی پولولان بر روی برگ‌ها بسته به نازکی مزوفیل به‌صورت خشکیدگی دیده می‌شود که باعث عدم جذب اکسیژن در این ناحیه می‌گردد. احتمالاً خشکیدگی بافت برگ یک عمل شیمیایی نیست و می‌تواند واکنشی فیزیکی یا واکنش ترکیبات داخلی بوجودآمده در گیاه باشد (Sparapano *et al.*, 2000a). به‌طور کلی مناسب‌ترین روش مبارزه با بیماری‌ها استفاده از ارقام مقاوم است. اصلاح گیاهان به روش انتخاب، وقت‌گیر بوده و در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست (Shahpiri *et al.*, 2004). گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم را می‌توان با قراردادن سلول‌های گیاهی در معرض عوامل بیماری‌زا یا متابولیت‌های استخراج شده از آنها و سپس باززایی گیاهان از سلول‌های زنده، انجام داد (De Rafael *et al.*, 2001).

## مواد و روش‌ها

### استخراج متابولیت ثانویه (پولولان)

استرین‌های جدا شده از تنه انگور دارای علایم بیماری اسکا از خراسان شمالی شامل جدایه‌های مختلف *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch)، *Phaeoacremonium aleophilum* (Pa1) و *Fomitiporia mediterranea* (Fme) بودند که برای این تحقیق از کلکسیون جدایه‌های میکروبی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان‌رضوی، تهیه شد (Bahrabadi *et al.*, 2012).از کشت ۱۰ روزه هر یک از قارچ ها در محیط مایع سیب‌زمینی-دکستروز، پنج میلی‌لیتر

1- Scytalone
2- Isosclerone
3- Pullulan
4- Exopolysaccharids (EPS)

سوسپانسیون $10^6$ اسپور آماده گردید و به‌صورت جداگانه در داخل فلاسک‌های یک لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت زاپکس (CZ)[1] به همراه ۰/۱ درصد عصاره مالت و ۰/۱ درصد مخمر، کشت شدند. فلاسک‌ها بدون تکان‌دادن، در دمای ۲۵ درجه و به‌مدت ۲۸ روز در تاریکی نگهداری شدند. سپس میسلیوم با استفاده از پارچه ململ چهار لایه استریل، از عصاره جداسازی گردید. محلول حاصله به آرامی از کاغذ صافی نیتروسلولزی ۰/۲۲میکرومتری عبور داده شد. برای استخراج پولولان ابتدا عصاره فیلتر شده اولیه (۲ لیتر از هر قارچ) با حجم برابر محلول سرد اتانول–استون، مخلوط و سپس نمونه برای مدت چهار تا شش ساعت در حمام یخ صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رسوب متابولیت استخراجی توسط سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰ ثانیه، جداسازی گردید. سپس مجددا انحلال رسوب در آب گرم و افزودن هم حجم اتانول و استون انجام گردید و رسوب حاصله از فیلتر واتمن عبور داده شد. متابولیت حاصل، در ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Sparapano *et al*., 1998 ; Sparapano & Bruno, 1997).

## زیست‌سنجی برگ مو

بررسی پولولان حاصل از هر یک از قارچها روی برگ‌های جدا شده از پنج رقم انگور تجارتی شامل کلاهداری (KOL)، ترکمن ۸ (TU8)، ترکمن ۶ (TU6)، فخری شاهرود (FSH) و کشمشی قوچان (KQU) واقع در کلکسیون انگور مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، در اتاقک رشد انجام گرفت. برای این منظور، برگ‌ها به همراه دمبرگ ارقام مختلف بطور جداگانه در داخل محلول‌های سمی به میزان سه میلی‌لیتر قرار گرفتند تا جذب آنها به داخل برگ‌های جدا شده بطور کامل انجام شود. آب مقطر به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. برگ‌ها بعد از گذشت سه ساعت به داخل آب مقطر استریل منتقل و علایم پس از ۲۴ ساعت یادداشت شدند. در طی ارزیابی برگ‌ها در درجه حرارت پایین‌تر از ۲۳ و رطوبت ۶۰ درصد قرار گرفتند (Sparapano *et al*., 2000b). لازم به ذکر است که پولولان در آب گرم حل شده و با نسبت‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درصد تست شد.

## زیست‌سنجی کالوس مو

جوانه‌های جانبی به قطر تقریبی ۰/۵ و طول ۱/۵ سانتی‌متر از شاخه‌های درختان بالغ پنج رقم انگور به‌عنوان ریزنمونه جدا شدند. این ریزنمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه تحت جریان آب قرار گرفته و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول وایتکس حاوی یک درصد هیپوکلریت سدیم گذاشته شدند. در نهایت با سه بار شستشو با آب مقطر دو بار استریل، ضدعفونی انجام گرفت. محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ترکیبات هورمونی بنزیل آمینو پورین (BAP) (۱ میلی‌گرم بر لیتر) و نفتالین استیک اسید (NAA) (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، برای کشت ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. محیط‌های حاوی ریزنمونه‌های کشت شده جهت رشد به‌مدت یک ماه در دمای ۲۳ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند (Murashige & Skoog, 1962; Bolandi *et al.*, 2016). جهت آماده کردن محیط‌کشت MS برای تلقیح کالوس‌ها، میزان تمام عناصر تشکیل دهنده محیط‌کشت که شامل محلول ماکرو، آهن، ویتامین‌ها، گلیسین و میواینوزیتول بود به نصف تقلیل یافت ولی مقادیر ساکارز و آگار مصرفی ثابت بود، PH محیط روی ۵/۷ تنظیم گردید (Pijut *et al*., 1990). متابولیت سمی، به نسبت‌های ذکر شده با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل و به محیط MS اضافه شد. برای تیمار شاهد به جای توکسین، آب مقطر استریل استفاده شد. جهت مایه‌زنی، تکه‌ای از کالوس‌های سالم و زردرنگ (۰/۵گرم) انتخاب و در سطح محیط گذاشته شد. نمونه‌ها در تاریکی و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۴۵ روز وزن خشک کالوس اندازه‌گیری گردید ( Sparapano *et al*., 2000a).

هفت هفته پس از مایه‌زنی کالوس‌ها، به‌منظور اندازه‌گیری قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها در مواجهه با محیط‌کشت همراه با توکسین (پولولان)، از آزمون رنگ آمیزی با ماده تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید[2] (TTC)، استفاده گردید (Towill & Mazur, 1975). به این ترتیب که ۰/۵ گرم از کالوس‌های مایه‌زنی شده با عصاره قارچ در محلول بی‌رنگ تترازولیوم یک درصد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفتند. از الکل اتیلیک ۹۶ درصد برای رنگ‌بری استفاده شد. در این روش بر اساس مقدار فورمازان[3] حاصل از احیاء TTC بقاء سلول‌ها تخمین زده شد. این واکنش منجر به رنگ صورتی تا قرمز می‌گردد. جهت رنگبری از کالوس ابتدا محلول تترازولیوم موجود در لوله‌های آزمایش را خارج نموده و الکل اتیلیک را جایگزین آن می‌کنیم به‌طوری‌که حجم همه لوله‌ها تقریبا یکسان

1- Czapek Dox Medium

2- Triphenyl Tetrazolium Chloride

3- Formazan

باشد. پس از افزودن اتانول نمونه‌ها در حمام آب جوش (بن ماری) به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شدند، پس از نفوذ رنگ قرمز موجود در کالوس به الکل اتیلیک ۹۶ درصد و رنگی شدن محلول یا به عبارتی استخراج رنگ از نمونه‌ها، کالوس‌ها از ظروف خارج گردید. مایع مورد نظر در تیمارهای مختلف رنگ‌های متفاوتی از سفید صورتی تا قرمز به خود می‌گیرد. سپس میزان جذب نور (OD) در طول موج ۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ( Elisa Reader Model Elx800) برآورد گردید (Pelah *et al.*, 2003). میزان زنده‌مانی سلول‌های کالوس با استفاده از فرمول زیر بدست آمد (Ibrahim & Quick, 2001).

$$x = \frac{\text{OD تیمار مایه‌زنی شده}}{\text{OD شاهد}} \times 100$$

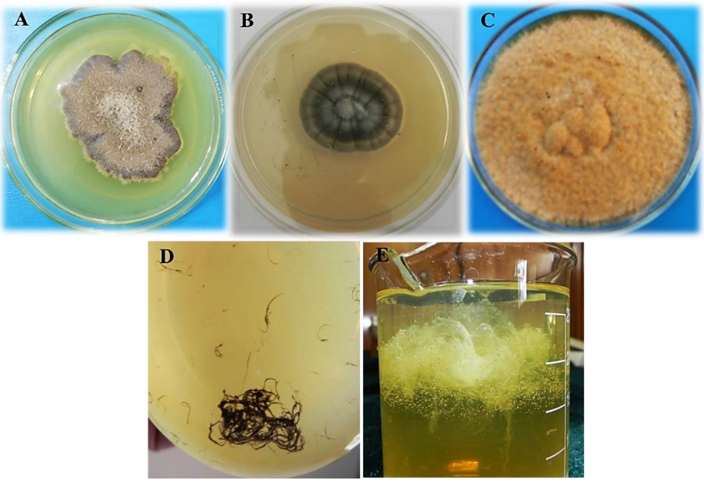
## تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

مایه زنی کالوس‌های پنج رقم انگور تجاری با سه غلظت توکسین (پولولان) استخراجی از سه قارچ مولد اسکای مو انجام شد. آزمایشات با استفاده از طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم فزار SAS و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح اطمینان پنج درصد ارزیابی شد.

## نتایج

### استخراج اگزوپلی ساکارید (پولولان)

بعد از گذشت ۲۸ روز در محیط‌کشت زاپکس قارچ‌های Pal، Pch و Fme هر سه قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه سمی بودند (شکل ۱).



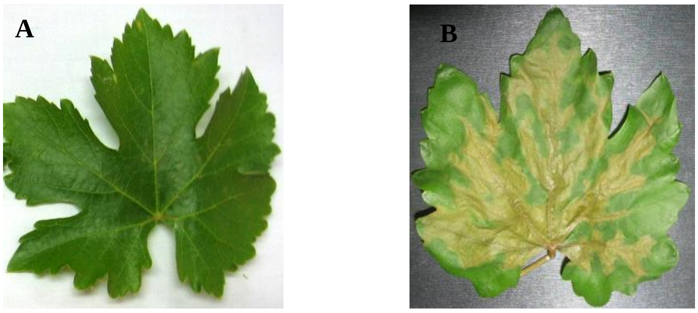
**شکل ۱- پرگنه قارچ‌های مولد اسکا**

**A) *Phaeoacremonium aleophilum* (Pa1), B) *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), C) *Fomitiporia mediterranea* (Fme)**
**کلاف سفید و قهوه‌ای رنگ اگزو پلی‌ساکارید (پولولان)(E,D)**

**Figure 1- The colony of esca-associated fungi and extracted their metabolites. A) *Phaeoacremonium aleophilum* (Pa1), B) *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), C) *Fomitiporia mediterranea* (Fme). D and E) White and brown extracted Exopolysaccharide (Pullulan)**

### زیست‌سنجی برگ‌های انگورجدا شده

برگ‌های انگور جدا شده از ارقام مورد آزمایش در برابر متابولیت استخراجی پس از گذشت ۱۲ تا ۲۴ ساعت علایمی بصورت آب سوختگی پهنک برگ (بین رگبرگ‌ها) را نشان دادند و پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قسمت‌های آب‌سوخته نکروزه و قهوه‌ای شدند. علایم ایجاد شده در این برگ‌ها توسط متابولیت حاوی توکسین (پولولان) مشابهت زیادی به علایمی که قارچ بیمارگر در گیاهان ایجاد می‌کند، دارد (شکل ۲).




**شکل ۲-واکنش برگ جدا شده انگور پس از گذشت ۲۴ ساعت در آب مقطر (A) برگ سالم-شاهد و (B) جذب متابولیت سمی (پولولان)**

**Figure 2- Symptoms of the absorption of toxic metabolites (pullulan) on detached leaves (A) control, (B) pullulan**

### اثر توکسین بر کاهش وزن کالوس

**جدول ۱- تجزیه واریانس وزن خشک کالوس ارقام مختلف انگور در برابر متابولیت ثانویه (پولولان)**

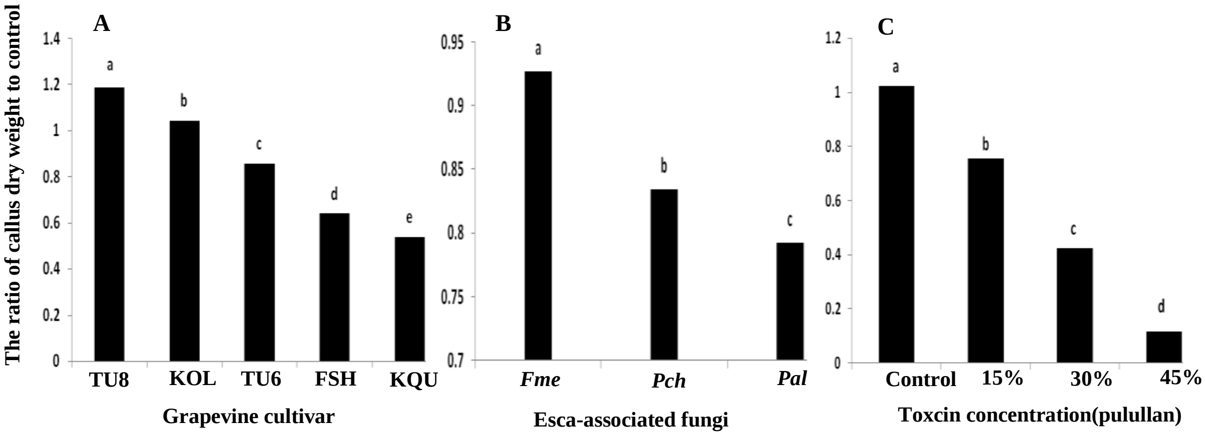
**Table 1- Analysis of variance (mean of squares) of callus dry weight ratio of different grape cultivars against Pullulan**

| SOV | DF | Mean of Square |
|---|---|---|
| Fungi Treatment | 2 | 0.02* |
| Concentration Treatment | 3 | 4.894* |
| Cultivar Treatment | 4 | 0.312* |
| Fungi Treatment * Concentration | 6 | 0.004* |
| Fungi Treatment * Cultivar | 8 | 0.001* |
| Cultivar Treatment * Concentration | 12 | 0.041* |
| Cultivar Treatment * Concentration*Fungi | 24 | 0.001* |
| Error | 120 | 0.001 |
| CV | --- | 4.67 |

**، * و ns به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی‌داری هستند.

ns: non-significant ;**and*are significant at a probability level of 1 and 5%, respectively.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادکه اثر توکسین (پولولان) بر روی‌کاهش وزن خشک کالوس ارقام انگور در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شده است (جدول ۱). در شکل ۳ عکس‌العمل ارقام مختلف انگور در برابر توکسین (پولولان) به‌صورت کاهش وزن خشک کالوس نشان داده شده‌است. رقم انگور ترکمن ۸ نسبت به سایر ارقام مورد آزمایش دارای درصد کاهش وزن کالوس کمتری بوده است (۲۶٪) و پس از آن رقم کلاهداری (۳۱٪) و ترکمن ۶ (۴۰٪) در گروه‌های بعدی قرار گرفته‌اند. ارقام کشمشی قوچان و فخری شاهرود (به‌ترتیب ۴۸ و ۴۴٪ کاهش وزن) بیشترین کاهش وزن خشک کالوس را در پی داشته است که می‌توان پیش‌بینی حساسیت رقم کشمشی قوچان را در نظر داشت (شکل ۳A). در بین قارچ‌های مورد آزمایش پولولان تولیدی قارچ Fme (۲۵/۵٪) کمترین اثر و پولولان حاصل از قارچ Pal (۴۸٪) بیشترین اثر را روی کاهش وزن خشک کالوس نشان داده است. پولولان تولیدی قارچ Pch نیز میزان ۳۴٪ وزن کالوس را کاهش دهد. بنابر این می‌توان گفت که توکسین (پولولان) استخراجی از قارچ Pal کارائی بهتری نسبت به دو قارچ دیگر مورد آزمایش داشته است (شکل ۳B). در شکل ۳A نتایج حاصله از غلظت‌های مختلف توکسین (پولولان) از صفر ( شاهد) تا ۴۵٪ و عکس‌العمل وزن خشک کالوس نسبت به شاهد نشان داد که با افزایش میزان غلظت توکسین در محیط‌کشت MS، میزان وزن خشک کالوس کاهش می‌یابد. در غلظت ۴۵٪ وزن خشک کالوس تا حدود ۸۰٪ نسبت به شاهد کاهش یافته است. توکسین با غلظت ۳۰٪ به میزان ۴۷٪ و در غلظت ۱۵٪ به میزان ۳۶٪ توانست وزن کالوس تولیدی را کاهش دهد (شکل ۳C).



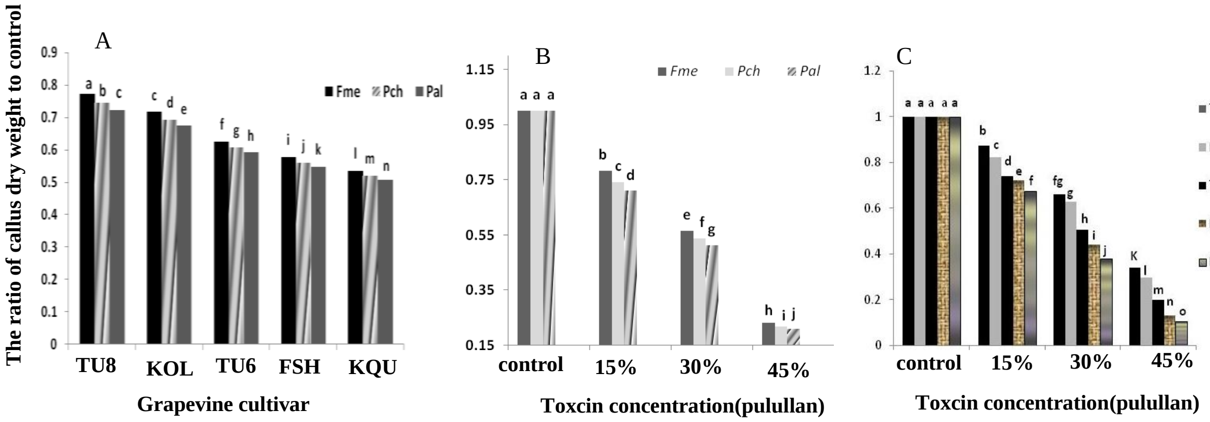

**شکل ۳- مقایسه میانگین وزن خشک کالوس به شاهد در تیمارهای (A)رقم: کلاهداری (KOL)، ترکمن ۸ (TU8)، ترکمن ٦ (TU6)، فخری شاهرود (FSH) و کشمشی قوچان (KQU)، (B) قارچ: *Phaeomoniella chlamydospora* (Pal), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pch), and *Fomitiporia mediterranea* (Fme) و (C)غلظت توکسین (پولولان)۱۵٪،۳۰٪ و ٤٥٪**

میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری ندارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪).

**Figure 3– Mean comparison of callus dry weight to control at different treatments. A) Grapevine cultivar:KOL, TU8, TU6, FSH, KQU, B) Esca-associated fungi;:*Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme) and, C) Toxin concentration(pullulan): 15%, 30%, 45%**

Similar letters in each column indicate no significant difference at the 5% probability level (Duncan's multiple range test).

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل توکسین (پولولان) در کاهش وزن کالوس ارقام انگور در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل وزن کالوس ارقام انگور نسبت به توکسین (پولولان) قارچ‌های مولد اسکا مو نشان داد که واکنش رقم کشمشی قوچان نسبت به متابولیت ثانویه تمامی قارچ‌های Pal(۵۰٪)، Pch (۴۷٪) و Fme (۴۸٪) کاهش وزن‌کالوس را در پی داشته است. همچنین رقم ترکمن ۸ نسبت به توکسین قارچ‌های Pal (۳۰٪)، Pch (۳۲٪) و Fme (۳۵٪) کمترین میزان کاهش وزن کالوس را نسبت به سایر ارقام انگور مورد آزمایش داشته است (شکل ۴A). میانگین اثرات متقابل غلظت‌های مختلف پولولان تولید شده توسط قارچ‌های مولد اسکا نشان داد که وزن خشک کالوس در غلظت ۱۵٪ توکسین کمترین و در غلظت ۴۵٪ توکسین بیشترین کاهش وزن کالوس را داشت. غلظت ۱۵٪ توکسین تولیدی حاصل از قارچ Fme کمترین اثر روی کاهش وزن کالوس و در مقابل توکسین حاصل از قارچ Pal بیشترین اثر را در کاهش وزن‌کالوس نسبت به شاهد نشان داد. این روند نیز در غلظت‌های ۳۰٪ و ۴۵٪ نیز به چشم می‌خورد (شکل ۴B). اثرات متقابل ارقام مختلف انگور و توکسین تولیدی توسط قارچ‌های مختلف اسکا نشان داد که در غلظت ۱۵٪ توکسین رقم ترکمن ۸ (۱۲٪) و پس از آن رقم کلاهداری (۲۸٪) کاهش وزن خشک کالوس را نسبت به شاهد داشته است. رقم کشمشی قوچان و فخری شاهرود به‌ترتیب (۳۷٪) و (۳۳٪) کاهش وزن خشک کالوس نسبت به شاهد داشته که نشان‌دهنده حساسیت سلول‌های کالوس به توکسین می باشد. غلظت ۴۵٪ پولولان بر روی تمامی ارقام اثر کاهش دهنده شدیدی روی وزن خشک کالوس داشته و رقم ترکمن ۸ کمترین کاهش وزن خشک کالوس (۶۳٪) و رقم کشمشی قوچان (۹۰٪) بیشترین کاهش وزن خشک کالوس رانسبت به شاهد نشان داد (شکل ۴C).




**شکل ٤- مقایسه میانگین اثرات متقابل وزن خشک کالوس در تیمارهای مختلف (A) قارچ: *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme)×رقم :کلاهداری (KOL)، ترکمن ۸ (TU8)، ترکمن ٦ (TU6)، فخری شاهرود (FSH) و کشمشی قوچان (KQU)، (B) قارچ: *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme)×غلظت توکسین (پولولان): ۱۵٪،۳۰٪ و ٤٥٪ و (C) رقم: کلاهداری (KOL)، ترکمن ۸ (TU8)، ترکمن ٦ (TU6)، فخری شاهرود (FSH) و کشمشی قوچان (KQU) ×غلظت توکسین (پولولان) ۱۵٪، ۳۰٪ و ٤٥٪**

میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری ندارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪).

**Figure 4– Mean comparison of callus dry weight to control at different treatments. A) Grapevine cultivar (KOL, TU8, TU6, FSH, KQU) and Toxin concentration (pullulan) (15%, 30%, 45%), B) Esca-associated fungi :*Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme) and Grapevine cultivar (KOL, TU8, TU6, FSH, KQU), and C) Esca-associated fungi: *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme) and Toxin concentration (pullulan) (15%, 30%, 45%)**

Similar letters in each column indicate no significant difference at the 5% probability level (Duncan's multiple range test).

مجموع اثرات متقابل رقم، غلظت توکسین و قارچ‌های عامل مولداسکا نشان داد که رقم ترکمن ۸ در مقابل غلظت ۴۵٪ توکسین تولید شده توسط قارچ Pal(۶۵٪) کمترین و رقم کشمشی قوچان (۹۰٪) بیشترین کاهش وزن کالوس نسبت به شاهد را در پی داشت و بدنبال آن رقم کلاهداری و ترکمن ۶ به‌ترتیب ۷۸٪ و ۸۱٪ کاهش وزن خشک کالوس را نشان داد. در غلظت ۳۰٪ توکسین تولیدی توسط قارچ Pch نیزکاهش وزن خشک کالوس در رقم ترکمن ۸ به میزان ۳۰٪ و در رقم کشمشی قوچان به میزان ۶۷٪ بود.

## اثر توکسین بر زنده‌مانی سلول‌های کالوس بر اساس جذب نوری

**جدول ۲- تجزیه واریانس شدت جذب نوری سلول‌های کالوس ارقام مختلف انگور در برابر متابولیت ثانویه (پولولان)**

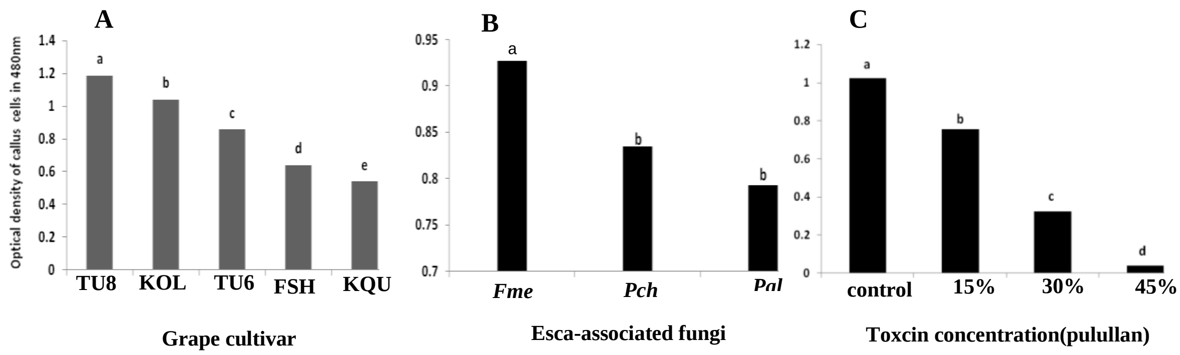
**Table 2-Analysis of optical density variance (mean of squares) of callus dry weight ratio of different grape cultivars against Pullulan**

| Source of Variation | DF | Mean of Square |
| --- | --- | --- |
| Fungi | 2 | 0.285* |
| Concentration | 3 | 7.773* |
| Cultivar | 4 | 2.636* |
| Fungi * Concentration | 6 | 0.022* |
| Fungi * Cultivar | 8 | 0.008* |
| Cultivar * Concentration | 12 | 0.049* |
| Cultivar * Concentration*Fungi | 24 | 0.001* |
| Error | 120 | 0.078 |
| CV% | --- | 7.87 |

**، * و ns به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی‌داری هستند.

ns: non-significant, **and*are significant at a probability level of 1 and 5%, respectively.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که توکسین (پولولان) استخراج شده از قارچ‌های مولد اسکای مو در شدت جذب نوری کالوس پنج رقم انگور مورد آزمایش در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). سلول‌های کالوس رقم ترکمن ۸ بیشترین شدت جذب نوری را داشت یعنی تعداد سلول‌های زنده آنها نسبت به سایر ارقام بیشتر بود. رقم کشمشی قوچان با حداقل سلول‌های زنده کالوس حساسیت بیشتری به توکسین نشان داد و دارای شدت جذب نوری کمتری بود (شکل ۵A). نتایج نشان دادند که متابولیت سمی تولیدی توسط سه قارچ مولد بیماری اثرات متفاوتی در شدت جذب نور داشتند. توکسین قارچ Fme دارای کمترین اثر بر روی سلول‌های کالوس بود ولی در مقابل توکسین تولیدی دو قارچ دیگر Pal و Pch هر دو اثرات مخرب‌تری روی زنده‌مانی سلول‌های کالوس داشتند (شکل ۵B). هرچه غلظت توکسین در محیط افزایش یافت، میزان مرگ‌ومیر سلول‌های کالوس نیز بیشتر شد (شکل ۵C).



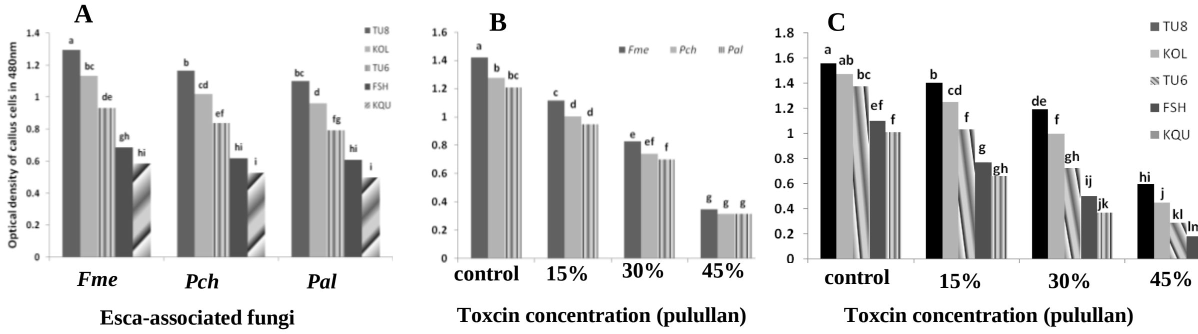

**شکل ۵- مقایسه میانگین شدت جذب نوری سلول‌های کالوس در تیمارهای (A)رقم: کلاهداری (KOL)، ترکمن ۸ (TU8)، ترکمن ٦ (TU6)، فخری شاهرود (FSH) و کشمشی قوچان (KQU)، (B)قارچ : *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), and *Fomitiporia mediterranea* (Fme) و(C) غلظت توکسین (پولولان)۱۵٪، ۳۰٪ و ٤٥٪**

میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری ندارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪).

**Figure 5- Mean comparison of optical density of callus cells at different treatments A) Grapevine cultivar: KOL, TU8, TU6, FSH, KQU, B) Esca-associated fungi:*Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme) and, C) Toxin concentration(pullulan): 15%, 30%, 45%**

Similar letters in each column indicate no significant difference at the 5% probability level (Duncan's multiple range test).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اثرات متقابل توکسین تولیدی قارچ‌های مولد اسکای مو در شدت جذب نوری کالوس ارقام انگور در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (شکل ۶). بیشترین میزان جذب نوری سلول‌های کالوس در توکسین‌های حاصل از قارچ Fme در رقم ترکمن ۸ مشاهده شد و پس از آن به‌ترتیب رقم کلاهداری، ترکمن ۶، فخری شاهرود و کشمشی قوچان به توکسین حاصل از قارچ Fme واکنش نشان دادند. توکسین قارچ Pal نیز دارای بیشترین اثر بود و سلول‌های زنده کالوس دارای حداقل مقدار بودند (شکل ۶A). همچنین نتایج اثرات متقابل قارچ نشان داد که بیشترین میزان شدت جذب نوری سلول‌های کالوس در تمامی قارچ‌های Fme، Pch و Pal در غلظت صفر (شاهد) وجود دارد. در غلظت ۱۵ درصد بیشترین میانگین جذب نوری در متابولیت حاصل از قارچ Fme و کمترین جذب نوری در توکسین حاصل از قارچ Pal مشاهده شد. با افزایش غلظت توکسین‌های حاصل از تمامی قارچ‌ها کاهش معنی‌داری در جذب نوری مشاهده شد (شکل ۶B). همچنین نتایج نشان دادند که اثر متقابل رقم درغلظت توکسین نیز بسیار معنی‌دار بود. در تمامی غلظت‌های توکسین (پولولان)، بیشترین جذب نوری به‌ترتیب مربوط به رقم ترکمن ۸ بود و بعد از آن به‌ترتیب کلاهداری، ترکمن ۶ فخری شاهرود و کشمشی قوچان قرار داشتند، گرچه با افزایش غلظت توکسین در تمامی ارقام کاهش بسیار معنی‌دار شدت جذب نوری مشاهده شد. در نتیجه رقم ترکمن ۸ مقاومت نسبی به توکسین داشته و رقم کشمشی قوچان بیشترین حساسیت را نشان داد. پس از گذشت ۷ هفته از کشت کالوس، در غلظت ۱۵ درصد میزان زنده‌مانی سلول‌های کالوس ارقام انگور ۷۴ تا ۸۰/۵ درصد و در غلظت شاهد به ترتیب ۷۹/۵ و ۸۴ درصد بود. درصد حیات در سلول‌های کالوس مایه‌زنی شده ترکمن ۸ در غلظت ۴۵ درصد توکسین حدود ۵۰/۳۶ درصد و میزان زنده‌مانی در رقم کشمشی قوچان حدود ۱۵/۵۱ درصد بود (شکل ۶C).



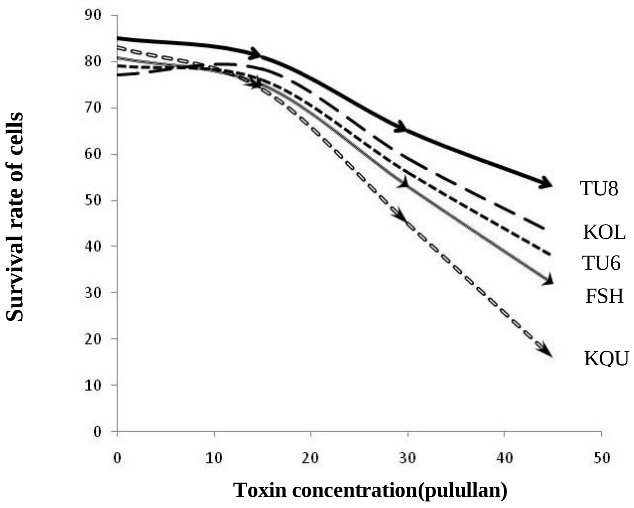

**شکل ٦- مقایسه میانگین اثرات متقابل شدت جذب نوری سلول‌های کالوس در تیمارهای مختلف (A) قارچ: *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme)×رقم: کلاهداری (KOL)، ترکمن ۸(TU8)، ترکمن ٦ (TU6)، فخری شاهرود (FSH) و کشمشی قوچان (KQU)، (B) قارچ: *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme)×غلظت توکسین (پولولان): ۱۵٪،۳۰٪ و ٤٥٪ و (C) رقم: کلاهداری (KOL)، ترکمن ۸ (TU8)، ترکمن ٦ (TU6)، فخری شاهرود (FSH) و کشمشی قوچان (KQU) ×غلظت توکسین (پولولان) ۱۵٪، ۳۰٪ و ٤٥٪**

میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری ندارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪).

**Figure 6– Mean comparison of callus dry weight to control at different treatments. A) Grapevine cultivar (KOL,TU8,TU6,FSH,KQU)and Toxin concentration(pullulan) (15%,30%,45%), B) Esca-associated fungi :*Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme) and Grapevine cultivar (KOL, TU8, TU6, FSH, KQU), and C) Esca-associated fungi: *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fme) and Toxin concentration (pullulan)(15%, 30%, 45%)**

Similar letters in each column indicate no significant difference at the 5% probability level (Duncan's multiple range test).

با افزایش غلظت توکسین (پولولان) درصد زنده‌مانی سلول‌های کالوس در پنج رقم انگور مورد آزمایش کاهش یافت و بنابراین درصد زنده‌مانی سلول‌ها با افزایش غلظت توکسین رابطه معکوسی نشان داد (شکل ۷). در غلظت‌های ۳۰ و ۴۵ درصد توکسین، میزان مرگ و میر در سلول‌های کالوس بیشتر بود. در غلظت ۱۵ درصد نیز میزان زنده مانی سلول‌های کالوس ارقام انگور ۷۴ تا ۸۰/۵ درصد و در غلظت شاهد به‌ترتیب ۷۹/۵ و ۸۴ درصد زنده‌مانی بوده است. درصد حیات در سلول‌های کالوس مایه‌زنی شده ترکمن ۸ در مقایسه با رقم کشمشی قوچان در غلظت ۴۵ درصد از پولولان حدود ۵۰/۳۶ درصد در صورتی که میزان زنده‌مانی در رقم کشمشی قوچان حدود ۱۵/۵۱ درصد بود. به‌عبارت دیگر پس از گذشت ۷ هفته از کشت کالوس رقم ترکمن ۸ در غلظت ۴۵٪ توکسین حدود ۵۰ درصد از سلول‌های کالوس بر روی محیط ۱/۲ MS زنده ماندند، در حالی‌که در رقم کشمشی قوچان در غلظت ۴۵٪ از توکسین حدود ۱۹٪ از سلول‌های کالوس زنده باقی ماندند.




**شکل ۷- درصد زمانی سلول‌های کالوس پنج رقم انگور (ترکمن ۸-TU8، کلاهداری -KOL، ترکمن ٦-TU6، فخری شاهرود-FSH، کشمشی قوچان-KQU)**

**Figure 7- Percentage of callus cell survival of five grapevine cultivars( Turkman 8-TU8, Kolahdari-KOL, Turkman 6- TU6, Fakhri ShahroodT, Keshmeshi Qouchan-KQU)**

## بحث

اویدنت و همکاران در سال ۲۰۰۰ متابولیت‌های سمی مختلفی از محیط‌کشت‌های Pal جداسازی کردند. دو تا از متابولیت‌های مهم این قارچ که توسط روش اسپکتروفتومتری و روش شیمیائی بررسی و تحت عنوان سیتالون و ایزواسکلرون شناسائی گردید. ارزیابی روی برگ‌های جدا شده رقم ایتالیا (Italia) با میزان ۰/۰۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از متابولیت ایزو اسکلرون ایجاد رنگ پریدگی، روشن شدن برگ‌ها و نهایتا کلروز برگی، لکه‌های گرد بین رگبرگ‌ها و در حاشیه برگ‌ها مشاهده گردید. متابولیت ایزواسکلرون به میزان ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر سبب لکه‌های کلروتیک بزرگ و نهایتا نکروز همراه با تخریب لامینا[1]می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر نیز حضور پولولان در متابولیت‌های استخراجی از قارچ‌های مولد اسکا Pal، Fme، Pch تائید و باعث بروز علائم مختلفی برگی بر روی ارقام مختلف انگور گردید. در انگور بیشترین مکانیسم دفاعی مشاهده شده مربوط به تجمع ترکیبات فنلی است. برونو و سپاراپانو (Bruno & Sparapano, 2006) تحقیقات وسیعی بر روی میزان فنل روی کالوس، فعالیت‌ها و واکنش‌های بیوشیمیایی فنل‌ها بویژه دو متابولیت سمی و α-glucan (پولولان) تولید شده توسط دو قارچ *Phaeomoniella chlamydospora* و *Togninia minima* در محیط‌های کشت مایع و کالوس و همچنین نقش سیتالون و ایزواسکلرون، در سنتز ملانین و بیماری‌زایی آن، انجام دادند و نتایج نشان داد که اختلاف فاحشی بین واکنش‌های کالوس دو رقم انگور در مقابل آلودگی به دو قارچ یاد شده، وجود دارد. وزن ترکالوس اختلاف زیادی در رقم حساس به بیماری اسکا با شاهد داشت. همچنین اختلافات زیادی بین رقم حساس و نیمه مقاوم در قهوه‌ای شدن بافت، تجمع میزان فنل و نفوذ به داخل سلول در مقابل قارچ های مولد وجود داشت. کالوس‌هایی که در مقابل قارچ‌های مولد بیماری در پتری و داخل انکوباتور قرار داده شده منتج به افزایش سریع رشد پرگنه قارچ‌ها شد و در مقابل رشد کالوس در هر دو رقم در مقابل قارچ‌های مولد کاهش چشم‌گیری داشت، زمانی‌که پرگنه قارچ نزدیک کالوس می‌رسد رشد آن متوقف شده و زمانی‌که کالوس بطور کامل با هر یک از پرگنه‌ها نزدیک می‌شود رنگ آن تغییر یافته و به رنگ قهوه‌ای در می‌آید. در خصوص شدت جذب نوری سلول‌های کالوس باید یادآوری نمود که انجام رنگ‌آمیزی با ماده TTC و درصد زنده‌مانی سلول‌های کالوس می‌تواند تا حدود زیادی تغییرات سلول‌ها را در برابر متابولیت‌های داخل محیط‌کشت نشان دهد. هر چه میزان شدت جذب نوری توسط دستگاه اسپکترومتری بیشتر باشد میزان سلول‌های زنده کالوس در محیط بیشتر خواهد بود و افزایش ماده قرمزرنگ (Fmearazin) در محلول الکلی نشان‌دهنده زنده‌مانی بیشتر سلول‌های کالوس بوده و برخلاف آن یعنی هر چه میزان ماده رنگی در محلول کمتر باشد بخاطر جذب بیشتر ماده قرمز در پروتوپلاست سلولی بوده و کمتر به داخل محلول الکلی نشت کرده و رسوب بیشتری در سلول‌های مرده دارد، و بنابراین محلول الکلی رنگ کمتری بخود می‌گیرد و شدت جذب نوری کمتر خواهد بود که نشان

1-lamina

دهنده وجود سلول‌های مرده در کالوس می‌باشد. شیمومورا و هاسبه (Shimomura & Hasebe, 2004) میزان زنده‌مانی و تخریب سلول‌های بافت داخلی پوست تنه بلوط توسط قارچ *lentinula* را با استفاده از روش طیف‌سنجی نمک TTC تخمین زدند و گزارش کردند که این روش می‌تواند میزان نسبتا دقیق سلول‌های تخریب شده را نشان دهد. ممغانی و همکاران (Mamaghani *et al*., 2012) گزارش کردند که استفاده از روش زنده‌مانی سلول‌ها در ارزیابی مقاومت و حساسیت ارقام نارون روشی مناسب بوده و می‌توان با استفاده از اثر عصاره خام قارچ *Ophiostoma* بر روی سلول‌های کالوس میزان مقاومت و حساسیت دو رقم نارون چینی و اوجا را تعیین نمود. در تحقیق اخیر نیز زنده‌مانی سلول‌های کالوس ۵ رقم انگور تجاری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که رقم ترکمن ۸ در واکنش به توکسین (پولولان) دارای بیشترین درصد زنده‌مانی و در مقابل رقم کشمشی قوچان دارای کمترین درصد زنده‌مانی سلول کالوس بود. با توجه به اهمیت کنترل بیماری که به روش‌های معمول به دشواری می‌توان این بیماری مدیریت نمود و یکی از روش‌هایی که می‌تواند از شدت بیماری در منطقه جلوگیری کند استفاده از ارقام نسبتا مقاوم می‌باشد. در مرحله اول انتخاب ارقام نسبتا مقاوم به بیماری و جایگزینی آن با ارقام حساس و مرسوم منطقه نقش بسزائی در کنترل بیماری خواهد داشت و انتخاب ارقام و ارزیابی مقاومت و حساسیت آن به بیماری اسکای موکاری دشوار و مدت زمان طولانی لازم دارد ولی با استفاده از روش کشت بافت و عکس‌العمل سلول-های کالوس نسبت به متابولیت‌های ثانویه می‌تواند در انتخاب ارقام متحمل به بیماری اسکا سرعت بخشیده و نتایج قابل قبولی را ارائه دهد.

## References


1. Bahrabadi, M., Karimishahri, M.R., &Hashemi, M. (2012). Study on Genetic Variability in Fungi Associated with Esca Disease in North Khorasan Province Vineyards with RAPD-PCR. *Journal of Plant Protection Research.* 26:92-100.https://doi.org/ 10.22067/jpp.v26i1.12721.
2. Beris, E., Selim, M., Kechagia, D., & Evangelou, A. (2022). Overview of the esca complex as an increasing threat in vineyards worldwide: Climate change, control approaches and impact on grape and wine quality. In *Recent Advances in Grapes and Wine Production-New Perspectives for Quality Improvement*. IntechOpen.
3. Bolandi, A.R., Hamidi, H., & Rezagholy, A.A. (2016). Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture conditions. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *29*(1), 1-14. (In Persian with English abstract)
4. Bruno, G., & Sparapano, L. (2006a). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *69*(4-6), 195-208. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.04.007
5. Bruno, G., & Sparapano, L. (2006b). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *69*(4-6), 209-223. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.04.008
6. De Rafael, M.A., Valle, T., Babiano, M.J., & Corchete, P. (2001). Correlation of resistance and $H_2O_2$ production in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi*. *Physiologia Plantarum*, *111*(4), 512-518. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110411.x
7. Evidente, A., Sparapano, L., Andolfi, A., & Bruno, G. (2000). Two naphthalenone pentakides from liquid cultures of «*Phaeoacremonium aleophilum*», a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, *39*(1), 162-168. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1559
8. Fischer, M., & Payghami Ashnaei, S. (2019). Grapevine, esca complex, and environment: The disease triangle. *Phytopathologia Mediterranea*, *58*(1), 17-37. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-25086
9. Fox, H. (2022). A review of blackfoot, petri, and esca; grapevine fungal diseases, their treatments and the impacts of copper based fungicides. *Ecorestoration: RNS Technical Series*, (1).
10. Gramaje, D., Mostert, L., & Armengol, J. (2011). Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, *50*(4), 112-126. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8723
11. Graniti, A., Durbin, R.D., & Ballio, A. (Eds.). (2013). *Phytotoxins and plant pathogenesis* (Vol. 27). Springer Science & Business Media. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73178-5
12. Ibrahim, A.M., & Quick, J.S. (2001). Heritability of heat tolerance in winter and spring wheat. *Crop Science*, *41*(5), 1401-1405. https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151401x
13. Mostert, L., Groenewald, J.Z., Summerbell, R.C., Gams, W., & Crous, P.W. (2006). Taxonomy and pathology of Togninia (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, *54*, 1-113. https://doi.org/10.1016/S0166-0616(14)60211-6
14. Mamaghani, M., Rahnama, K., Mashayekhi, K., & Haghighi, H. (2012). Application of culture filtrates of

*Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi* under *in vitro* condition as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus parvifolia* and *Ulmus campestris*. *Journal of Plant Production Research*, *19*(4). (In Persian with English abstract)

15. Mugnai, L., Graniti, A., & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, *83*(5), 404-418. https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.404
16. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
17. Pelah, D., Kaushik, R.A., Nerd, A., & Mizrahi, Y. (2003). Validity of in vitro viability tests for predicting response of different vine cacti in the field to high and low temperatures. *Journal of the Association for Cactus Development*, *Chapingo*, *5*, 65-71.
18. Pijut, P.M., Domir, S.C., Lineberger, R.D., & Schreiber, L.R. (1990). Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. *Plant Science*, *70*(2), 191-196. https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90133-9
19. Shahpiri, A., Omidi, M., Tehrani, P.A., & Davoodi, D. (2004). A study of tissue culture and somaclonal variation in potato. *Iranian Journal Agriculture Science*, *35*(2), 323-335. (In Persian with English abstract)
20. Shimomura, N., & Hasebe, K. (2004). Estimation of viability of inner bark tissue of *Quercus serrata*, a substrate for log cultivation of *Lentinula edodes*, using the TTC assay method. *Mycoscience*, *45*(5), 362-365. https://doi.org/10.1007/S10267-004-0188-6
21. Sparapano, L., & Evidente, A.A. (1995). Studies on structure-activity relationship of seiridins, phytotoxins produced by three species of *Seiridium*. *Natural Toxins*, *3*(3), 166-173. https://doi.org/10.1002/nt.2620030308
22. Sparapano, L., & Bruno, G. (1997). Production of pullulans by virulent and hypovirulent strains of *Cryphonecteria parasitica*. Proccedings 10$^{th}$ Congress of Mediterranean Phytopathological Union, June 1-5, 1997. Montepellier, Societe Francasie de pathologie-ORSTOM, Montpellier, France, 488-493.
23. Sparapano, L., Bruno, G., & Graniti, A. (1998). Esopolisaccaridi fitotossici sono prodotii in coltura da due specie di Phaeoacremonium associate al complesso del mal dell esca della vite. Petria, *8*, 210-212.
24. Sparapano, L., Bruno, G., Ciccarone, C., & Graniti, A. (2000a). Infection of grapevines with some esca-disease associated fungi. II. Interaction among *Fomitiporia punctata*, *Phaeoacremonium chlamydosporum* and *P. aleophilum*. *Phytopathologia Mediterranea*, *39*, 53-58. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1543
25. Sparapano, L., Bruno, G., & Graniti, A. (2000b). Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, *39*(1), 169-177. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1535
26. Sparapano, L., Bruno, G., & Campanella, A. (2001). Interactions between three fungi associated with esca of grapevine and their secondary metabolites. *Phytopathologia Mediterranea (Italy)*. *40*(4), 417-422. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1626
27. Surico, G., Mugnai, L., & Marchi, G. (2008). The esca disease complex. In *Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria* (pp. 119-136). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8571-0_6
28. Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*(1), 5-10. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2870
29. Towill, L.E., & Mazur, P. (1975). Studies on the reduction of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Canadian Journal of Botany*, *53*(11), 1097-1102. https://doi.org/10.1139/b75-129